

(12)特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局(43) 国際公開日
2004年5月6日 (06.05.2004)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 2004/038022 A1

(51) 国際特許分類⁷: C12N 15/12, C07K 16/18, C12Q 1/68

(21) 国際出願番号: PCT/JP2003/013767

(22) 国際出願日: 2003年10月28日 (28.10.2003)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:
特願 2002-313076
2002年10月28日 (28.10.2002) JP

(71) 出願人(米国を除く全ての指定国について): 独立行政法人農業生物資源研究所 (NATIONAL INSTITUTE OF AGROBIOLOGICAL SCIENCES) [JP/JP]; 〒305-8602 茨城県つくば市観音台2丁目1-2 Ibaraki (JP).

(72) 発明者; および
(75) 発明者/出願人(米国についてのみ): 三橋 忠由 (MITSUHASHI, Tadayoshi) [JP/JP]; 〒305-0035 茨城県つくば市松代4丁目26-4 05-501 Ibaraki (JP).

(74) 代理人: 清水 初志, 外 (SHIMIZU, Hatsushi et al.); 〒300-0847 茨城県土浦市卸町1-1-1 関鉄つくばビル6階 Ibaraki (JP).

(81) 指定国(国内): AU, CA, US.

(84) 指定国(広域): ヨーロッパ特許 (DK, FR, GB, NL).

添付公開書類:
— 国際調査報告書

2文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイドスノート」を参照。



A1

(54) Title: METHOD OF EXAMINING SWINE GENETIC RESISTANCE TO RNA VIRUS-ORIGIN DISEASE

WO 2004/038022

(54) 発明の名称: ブタについてRNAウイルス由来の疾病に対する遺伝的抵抗性を知る方法

(57) Abstract: By studying how the deletion of 11 bases from swine Mx1 gene affects the capability of inhibiting the proliferation of influenza virus which is one of myxoviruses, it is revealed that the mutant with the deletion of the 11 bases completely loses the capability of inhibiting the proliferation of the virus. Therefore, the resistance to an RNA virus such as influenza virus or PRRS virus can be judged by detecting the deletion of these 11 bases in swine.

(57) 要約: ブタMx1遺伝子において、ミクソウイルスの1種であるインフルエンザウイルスの増殖抑制能が11塩基の欠損にどのように影響されるかについて研究を行い、11塩基欠損型はウイルス増殖抑制能を全く失っていることを明らかにした。ブタについて該11塩基の欠損を検出することにより、インフルエンザウイルス、PRRSウイルス等のRNAウイルスに対する抵抗性の判定を行うことができる。

- 1 -

明細書

ブタについて RNA ウィルス由来の疾病に対する遺伝的抵抗性を知る方法

5 技術分野

本発明は、ブタについて RNA ウィルス由来の疾病に対する遺伝的抵抗性を知る方法に関する。

背景技術

10 マウスからの知見で、Mx 遺伝子は、オルソミクソウイルスに属する（直鎖状 1 本鎖 RNA ウィルス）インフルエンザウィルス等の RNA ウィルスの増殖を抑制する（RNA 合成を阻害する）タンパク質を生産することが知られている。

豚には 2 つの Mx 遺伝子がありその一つが Mx1 遺伝子である。Mx1 遺伝子は 14 のエキソンから構成されている。梅山豚（メイシャントン；Meishan）の一部の個体はエキソン（exon）13 に 3bp (Ser) の欠損を持つ。また、ランドレース（Landrace）、デュロック（Duroc）等の西洋で家畜化され、世界に広く用いられているブタ品種の一部の個体は、最終エキソンに 11 塩基の欠損を持つ（Morozumi T. ら著、「Three types of olymorphisms in exon 14 in porcine Mx1 gene.」、Biochemical Genetics.、2001 年、Vol. 39、p. 251-260 参照）。

20 これまでに STAFF 研究所と本発明者のグループは協同で欠損型の存在とその存在割合を報告（Morozumi T. ら著、「Three types of olymorphisms in exon 14 in porcine Mx1 gene.」、Biochemical Genetics.、2001 年、Vol. 39、p. 251-260 参照）しているが、その中で、世界で最も広く用いられているランドレース種に 11 塩基欠損型が高い頻度で認められた。ランドレース種は肥育生産用の 3 元交雑 25 ブタ（図 1 写真）を作るのに広く用いられている。

一方、ニホンイノシシ、梅山豚など野生又は半野生の品種には 11 塩基欠損型は

これまで見出されていない。

また、1917年～1918年、スペイン風邪と呼ばれている、歴史に残る最大のインフルエンザが全世界で流行した。全世界では2千万人から4千万人が死亡した。

我が国でも30万人以上が死亡した。米国北西部から始まったスペイン風邪により、

5 米国内でも約60万人が死亡した。そのとき、ブタの集団にも風邪が流行していた、との報告がある。また、当時死亡した兵士の肺組織ホルマリン漬け・パラフィン包埋試料から取り出したRNAウイルスの系統解析では、このインフルエンザウイルスはヒトとブタに感染するグループに属し、その変化の際ヒトかブタかのどちらかがホストになったかは分からぬが、ヒトとブタのウイルスの共通祖先に近い、と報告されている。

米国北西部、アイオワ州などは現在でも養豚が盛んな地域である。当時の養豚がどのような状況であったのか不明であるが、既にランドレース種やこれを交配した交雑種が集約的に飼われていたとしたら、インフルエンザウイルス感受性を大きい割合で保持するブタ集団こそが、新たなウイルス発生の温床となり世界的15 疫病（Pandemic）を流行させたと推察される。なお、1917年当時米国にDuroc協会は既にあり、現在のDuroc種には11塩基欠損型をもつ個体が存在する。

家畜は定められた場所の限られた面積の中で高密度に飼養されている。高密度の飼養は、伝染性の疾病が一度発生すれば容易にその群内に広がり生産面で大きなダメージを与えることを意味する。また、高密度な家畜の飼養群はブタからヒトへのインフルエンザ伝搬の例が示すように、時には種を越えた新たな群へ疾病を伝搬する温床ともなる。このような危険を避けるために、現在では、疾病予防のワクチン接種が行われ、健全状態においてさえも抗生物質を混入した飼料が与えられている。このような予防措置をとっても、1998から2000年に米国で見られたような新型H3N2インフルエンザウイルス発生による豚生産の大きな損失等が25 起こりうる。また抗生物質の定的な投与は、食肉中の抗生物質の残存の点から消費者にとっての「食の安全」に不安を与えるものである。しかし、これらの

予防措置は、疾病による家畜の損失率を抑えるのに必要であるから行われているのである。現在の家畜の疾病抑制率を維持しつつあるいは向上させながら食の安全を守るには、家畜が潜在的にもつ疾病抵抗性を支配する遺伝情報の発見が必要であったが、そのような情報は発見されていなかった。

5 また、これまでのところ、ブタについて RNA ウィルス由来の疾病に対する遺伝的抵抗性を知ることが可能な有効な方法は知られていなかった。

発明の開示

本発明は、このような状況に鑑みてなされたものであり、その目的は、ブタについて RNA ウィルス、特にインフルエンザウィルスまたは PRRS (ブタ繁殖・呼吸障害症候群) 原因ウィルス由来の疾病に対する遺伝的抵抗性を知る方法を提供することにある。

家畜の特定の系統あるいは個体は「生産性は低いが特定の病気には強い」という抗病性形質を遺伝的に保有している場合がある。このような抗病性形質を生産性の高い系統へと引き継がせることができれば「生産性も高く病気にも強い」系統の作出が可能になり、必要とされた投薬量も減少する。遺伝する形質の分子レベルでの本体の究明はこれまで困難であったが、分子遺伝学の発展により、ヒトやマウスにおける多くの遺伝的形質について本体の究明が急速に進んでいる。家畜においてもこのような遺伝分子情報の中で、特定の疾病に対する抵抗性との関係が明らかにされるなら、当該遺伝情報を用いて抵抗性の家畜を選抜・育種することができる。

発明者はかつての研究の中で、家畜化されたブタの中には、ミクソウイルスの増殖を抑える Mx1 タンパクをコードする遺伝子に 11 塩基の欠損を持つ個体が存在することを明らかにしていた（論文として公表済み）。その後、欠損型 (c) をヘテロで持つ個体の割合に比べ欠損型をホモで持つ個体の割合が低いことに思い当った。例えば、これまでの調査から、ランドレース種内でヘテロの存在割合に対

して C ホモ型が少ないと、他の品種ではヘテロはいてもホモ型がいないことから、C のホモ型は生存に不利である、と推察された。なお、旧畜産試験場で 2000 年にランドレースを含む白色西洋品種約 40 頭を調査したときには C/C は 1 頭も存在していなかった。

5 また、養豚の現場から、ブタが呼吸器系の疾病に弱いこと、そのことが子豚の生産に大きく影響していることを知っていた。

そこで、Mx1 遺伝子において、ミクソウイルスの 1 種であるインフルエンザウイルスの増殖抑制能が 11 塩基の欠損にどのように影響されるかについて研究を行い、11 塩基欠損型はウイルス増殖抑制能を全く失っていることを明らかにし、本 10 発明に至った。

より詳細には、最終エキソンに 11bp の欠損を持つ Mx1 遺伝子では、11bp の欠損によって 3 塩基が 1 単位となるコドンがずれ、終止コドンが大きく後方へシフトし、下流でアミノ酸配列が大きく異なるため、Mx1 タンパク質は正常型（野生型）のそれと分子量も構造も大きく異なる。従って、ウイルス抑制能を失っている可能性が考えられた。

そこで、本発明者は、Mx1 遺伝子正常型（野生型）(a/a)、エキソン 13 の 3 塩基 (3bp) 欠損型 (b/b)、最終エキソンの 11 塩基 (11bp) 欠損型 (c/c)、ベクターのみを、マウス 3T3 細胞 (Mx1 活性をもたない) に導入し、インフルエンザウイルス A 型の感染試験を行った。

20 その結果、3bp 欠損型では野生型と同じようなウイルス増殖カーブを示し、ウイルス抑制能に影響がなく、ウイルス抑制能を保持していた（図 3 の最も右の矢印）。しかし、11bp 欠損型はウイルス増殖抑制能を全く失い（図 3 の最も左の矢印）、ベクターのみ導入と同じようにウイルスが、野生型に比べ 10 から 100 倍の増殖を示した。なお、ウイルス感染濃度はもう 1 段階低いレベル (MOI 1) でも行 25 い、同様の結果を得た。

特に世界中で広く用いられている家畜豚の中には、ウイルス抑制能を持たない

Mx1 遺伝子を保有している個体があり、本発明における実験結果から、RNA ウィルスの侵害に対する初期防衛能に大きな問題があることが予想される。

5 ブタ Mx1 遺伝子が持つ抗インフルエンザウィルス抑制能力は生物の長い歴史の中で生まれた形質であり、特別にインフルエンザウィルスのみに対する抑制能を持ち他の RNA ウィルスに対しては抑制能を示さないとは考えにくい。本実験では生産現場で最も問題となるインフルエンザウィルスを用いて実験を行ったが、インフルエンザウィルスのみに対して抑制能力を示すとは考えにくい。他の RNA ウィルスに対しても抑制効果があると考えるのが自然であり、例えば PRRS (豚繁殖・呼吸障害症候群) の原因となるコロナウィルス (PRRS 原因ウィルス) や他の RNA ウィルスに対しても抑制能力を示すと考えられる。

10 すなわち、ブタ Mx1 の当該部分の遺伝子配列型を知ることにより、ブタについて RNA ウィルス (例えば、インフルエンザウィルスまたは PRRS 原因ウィルス等) 由来の疾病に対する遺伝的抵抗性を知ることができる。さらに、Mx1 の 11 塩基欠損型の除去は、家畜の健康のみでなく人類に対する新たなインフルエンザウィルス発生の脅威を除くためにも重要であると考えられる。

15 現存する種 (品種) に遺伝子の部分欠損やアミノ酸置換をもたらす変異が存在する場合、その品種はこれらの変異を保持しながらその変異が生じた時点から、ある場合には数万年もの長い時間、世代交代を繰り返してきたことを意味する。すなわち、この変異は生命の維持や種の存続に大きなマイナスとなっていないことが考えられる。しかし一方では、個体生命の終止につながる致死遺伝子の存在も知られている。また、ある遺伝子の変化が遺伝子の高発現を維持し、例えば巨人症等を創り出す場合もある。すなわち、遺伝子に何らかの変化がある場合、その変化は生理的に有意な変化をもたらすのか、有意であった場合でも変化はどちらの方向に向くのかは、実験を経て初めて推察し得ることである。

20 さて本発明で見出された Mx1 遺伝子の第 14 エキソンに存在する 11 塩基の欠損は RNA ウィルスの増殖に対してどのような生化学的変化をもたらすのであろうか。Mx

遺伝子群は確かに抗インフルエンザ遺伝子と言われており、豚Mx1も抗インフルエンザ活性をもつであろうことまでは推察できる。しかし、全部で14エキソンある中での11塩基の欠損がインフルエンザ抑制能に変化をもたらすということは、容易に推察できるものではない。本発明者は、エキソン13に3塩基の欠損を持つ豚を5見出し、これについても同時に遺伝子導入・感染実験を行ったが（図4に示される3T3-3、インフルエンザ抑制能を失っていない。）、どちらの欠損がどのような影響をもつかを推察することは非常に困難である。

さらに、農場における本発明者の調査では、11塩基欠損型をホモに持つ豚の割合は最も高いランドレース種で14%であり、他の品種ではまれであり、ゼロの場合10もあった。一方、正常型と11塩基欠損型とをヘテロに持つ豚の割合はランドレース種では非常に高く57%、パークシャー種では16%、デュロック種では14%、ハンプシャー種では47%であった。

このような調査結果からは、たとえ当業者であっても、Mx1遺伝子の最終エキソンにある11塩基の欠損がRNAウイルス増殖抑制にどのような影響を及ぼすかを推察することは困難である。遺伝子の塩基配列データと農場からのデータだけではMx1の2種類の欠損は何ら影響を及ぼさないとの推察も可能であり、また、本発明をもって明らかにされる事実とは逆に欠損型は生存に有利との推察が出された場合、これを否定できないであろう。

11 塩基欠損型 Mx1 遺伝子がインフルエンザ増殖抑制能をほとんど持っていないという事実、第 13 エキソンの 3 塩基欠損はウイルス抑制能を失わせないという事実は、本発明に記されたマウス細胞への豚 Mx1 遺伝子導入と当該形質変換細胞に対するインフルエンザウイルス感染実験の結果をもってして初めて知り得たことである。

なお、Mx1 遺伝子の産物である Mx1 タンパクは生きている細胞の中（細胞質）25 で他のタンパクと協調してその効果を発揮する。見出された 11 塩基欠損型が正常型に比ベウイルス増殖抑制能をどの程度持っているか（あるいは失っているか）

を知るために、ウイルス増殖抑制能を持たない細胞（ここではマウス 3T3 細胞）に、正常型（野生型）遺伝子あるいは 11 塩基欠損型遺伝子を導入し、培養し、これらの豚 Mx1 遺伝子が発現していることを確認して、インフルエンザウイルスの感染試験を行い、ウイルスの増殖量を調べた。

5 これら一連の実験は高度なゲノム研究関連の知識と技術を必要とするものであり、一般の研究レベルでは通常、実施困難なものと考えられる。

本発明は、ブタについて RNA ウィルス由来の疾病に対する遺伝的抵抗性を知る方法に関し、より詳しくは、

〔1〕 RNA ウィルス、特にインフルエンザウイルスまたは PRRS 原因ウィルス抵抗性（RNA ウィルス由来の疾病に対する抵抗性）ブタを判定する方法であって、ブタ Mx1 遺伝子のエキソン上の配列番号：1 に記載の塩基配列における 2064 位～2074 位の 11bp の欠損を検出することを含む方法、

〔2〕 以下の (a)～(c) の工程を含む、〔1〕に記載の判定方法、
(a) 被検ブタから DNA を調製する工程
(b) ブタ Mx1 遺伝子のエキソンであって配列番号：1 に記載の塩基配列における 2064 位～2074 位の塩基配列を含む DNA を増幅する工程
(c) 増幅した DNA の塩基配列を決定する工程

〔3〕 以下の (a)～(d) の工程を含む、〔1〕に記載の判定方法、
(a) 被検ブタから DNA を調製する工程
(b) 調製した DNA を制限酵素により切断する工程
(c) DNA 断片をその大きさに応じて分離する工程
(d) 検出された DNA 断片の大きさを対照と比較する工程

〔4〕 以下の (a)～(e) の工程を含む、〔1〕に記載の判定方法、
(a) 被検ブタから DNA を調製する工程
(b) ブタ Mx1 遺伝子のエキソンであって配列番号：1 に記載の塩基配列

- 8 -

における 2064 位～2074 位の塩基配列を含む DNA を増幅する
工程

(c) 増幅した DNA を制限酵素により切断する工程

(d) DNA 断片をその大きさに応じて分離する工程

5 (e) 検出された DNA 断片の大きさを対照と比較する工程

[5] 以下の (a)～(e) の工程を含む、[1] に記載の判定方法、

(a) 被検ブタから DNA を調製する工程

(b) ブタ Mx1 遺伝子のエキソンであって配列番号：1 に記載の塩基配列
における 2064 位～2074 位の塩基配列を含む DNA を増幅する
工程

10 (c) 増幅した DNA を一本鎖に解離させる工程

(d) 解離させた一本鎖 DNA を非変性ゲル上で分離する工程

(e) 分離した一本鎖 DNA のゲル上での移動度を対照と比較する工程

[6] 以下の (a)～(d) の工程を含む、[1] に記載の判定方法、

15 (a) 被検ブタから DNA を調製する工程

(b) ブタ Mx1 遺伝子のエキソンであって配列番号：1 に記載の塩基配列
における 2064 位～2074 位の塩基配列を含む DNA を増幅する
工程

(c) 工程 (b) で増幅した DNA を質量分析器にかけ、分子量を測定する
工程

20 (d) 工程 (c) で測定した分子量を対照と比較する工程

[7] 以下の (a)～(f) の工程を含む、[1] に記載の判定方法、

(a) 被検ブタから DNA を調製する工程

(b) ブタ Mx1 遺伝子のエキソンであって配列番号：1 に記載の塩基配列
における 2064 位～2074 位の塩基配列を含む DNA を増幅する
工程

- 9 -

- (c) ヌクレオチドプローブが固定された基板を提供する工程
- (d) 工程 (b) の DNA と工程 (c) の基板を接触させる工程
- (e) 該 DNA と該基板に固定されたヌクレオチドプローブとのハイブリダイズの強度を検出する工程

5 (f) 工程 (e) で検出された強度を対照と比較する工程

[8] 以下の (a) および (b) の工程を含む、[1] に記載の判定方法、

- (a) 被検ブタからタンパク質試料を調製する工程
- (b) 該タンパク質試料に含まれる、ブタ Mx1 遺伝子のエキソンであって配列番号：1 に記載の塩基配列における 2064 位～2074 位の 11bp が欠損した塩基配列によってコードされるブタ Mx1 変異タンパク質の量を測定する工程

[9] 前記 11bp の欠損が検出された場合に被検ブタは RNA ウィルスに感受性であるものと判定され、検出されない場合に被検ブタは RNA ウィルスに抵抗性であるものと判定される工程、をさらに含む [1] ～ [8] のいずれかに記載の判定方法、

[10] RNA ウィルスがインフルエンザウィルス、または PRRS 原因ウィルスである、[1] ～ [9] のいずれかに記載の方法、

[11] [1] ～ [10] のいずれかに記載の判定方法のための PCR プライマーであって、ブタ Mx1 遺伝子のエキソンであって配列番号：1 に記載の塩基配列における 2064 位～2074 位の塩基配列を含む DNA 領域を増幅するためのオリゴヌクレオチド、

[12] ブタ Mx1 遺伝子のエキソンであって配列番号：1 に記載の塩基配列における 2064 位～2074 位の塩基配列を含む DNA 領域、または 2064 位～2074 位が欠損した塩基配列を含む DNA 領域とハイブリダイズし、少なくとも 15 ヌクレオチドの鎖長を有するオリゴヌクレオチド、

[13] ブタ Mx1 遺伝子のエキソンであって配列番号：1 に記載の塩基配列に

- 1 0 -

おける 2064 位～2074 位の 11bp が欠損した塩基配列によってコードされるブタ Mx1 変異タンパク質を認識する抗体、

〔14〕 〔11〕 もしくは〔12〕に記載のオリゴヌクレオチド、または〔13〕に記載の抗体を含む、RNA ウィルス抵抗性（RNA ウィルス由来の疾患に対する抵抗性）ブタの判定用試薬、

〔15〕 RNA ウィルスがインフルエンザウィルス、または PRRS 原因ウィルスである、〔14〕に記載の判定用試薬、

を提供するものである。

本発明は、RNA ウィルス抵抗性のブタを判定する方法であって、ブタ Mx1 遺伝子のエキソン上の配列番号：1 に記載の塩基配列における 2064 位～2074 位の 11bp の欠損を検出することを含む方法を提供する。

本発明において「RNA ウィルス抵抗性」とは、例えば、「RNA ウィルス由来の疾患に対する抵抗性」等を意味する。

本発明において RNA ウィルスとは、例えば、インフルエンザウィルス、PRRS（豚繁殖・呼吸障害症候群）の原因となるコロナウィルスウィルス（PRRS 原因ウイルス）等を挙げることができる。

インフルエンザウィルスと PRRS 原因ウイルスはどちらの外観も球形または多型性ピリオンであり類似している。さらに、どちらもゲノムサイズが 10 Kb から 30 Kb の直鎖状の 1 本鎖 RNA を持つウイルスであり、細胞質内でタンパク合成がなされる。Mx1 タンパク質は、ウイルス RNA からホストの DNA へ転写された情報を再び RNA へと転写する逆転写の過程を細胞質内で阻害することから、インフルエンザウィルスとゲノムサイズの類似する PRRS 原因ウイルスについても本発明は同様に実施できると考えられる。本発明における RNA ウィルスは、特に制限されるものではないが、好ましくは、インフルエンザウィルス、または PRRS 原因ウイルスである。

上記 Mx1 遺伝子の最終エキソンの塩基配列を配列番号：1 に、該塩基配列によ

- 11 -

ってコードされるタンパク質のアミノ酸配列を配列番号：2に示す。当該配列は、当業者においては、PubMed アクセッション番号 M65087 によって容易に取得することができる。

本発明において「欠損」している 11bp は、Mx1 遺伝子の最終エキソン上の配
5 列 5'-gg cgc cgg ctc-3' であり、配列番号：1においては、2064～2074 位の塩基領域に相当する。仮に、公共のデータベースで公開される Mx1 遺伝子において、上記 11bp に相当する DNA の配列情報に若干の塩基種の相違（塩基の置換、欠失、挿入等）がある場合であっても、当業者においては、本明細書において開示された情報を基に、本発明の「11bp の欠損」が Mx1 遺伝子においてどの領域に
10 相当するのかを容易に知ることができる。本発明における「11bp の欠損」には、このように当業者において容易に見出すことが可能な上記の「11bp に相当する欠損」をも包含する。

尚、本発明において「11bp の欠損」とは、必ずしも、当該 11bp の領域のみが欠損している状態だけを指すものではない。即ち、当該 11bp の領域を含む 11bp
15 以上の DNA 領域が欠損した場合（例えば、当該 11bp の DNA に加えて、当該 11bp の DNA に隣接する数 bp の DNA までも含むような DNA 領域の欠損）であっても、本発明の「11bp の欠損」に含まれる。

本発明においては、被検ブタについて Mx1 遺伝子の最終エキソンにおいて上記の「11bp の欠損」がヘテロ型として検出された場合に、被検ブタは RNA ウィルス
20 （例えば、インフルエンザウィルス、PRRS 原因ウィルス等）抑制能を持たない Mx1 タンパク質を持っていると判断される。また上記の「11bp の欠損」がホモ型として検出された場合、被検ブタの細胞は RNA ウィルス（例えば、インフルエンザウィルス、PRRS 原因ウィルス等）抑制能を持たない Mx1 タンパク質しか持たないと判断され、このことから、当該被検ブタは RNA ウィルス（例えば、インフルエンザウィルス、PRRS 原因ウィルス等）に高い感受性を示すと判断される。前記
25 「11bp の欠損」が検出されない場合に、被検ブタは RNA ウィルス（例えば、イン

フルエンザウイルス、PRRS 原因ウイルス等) に抵抗性であるものと判断される。

本発明の判定方法において、ブタ Mx1 遺伝子の最終エキソンの上記「11bp の欠損」を検出する方法(手段)は、上記「欠損」を検出可能な方法(手段)であれば特に制限されるものではないが、例えば、被検ブタの Mx1 遺伝子の上記欠損部位を含む最終エキソンの塩基配列を直接決定することにより行うことができる。

この方法においてはまず、被検ブタから DNA 試料を調製する。DNA 試料は、例えば被検ブタの臓器、または組織、あるいは細胞や血液、口腔粘膜、皮膚、毛等から抽出した染色体 DNA を基に、あるいはイントロンを含まない cDNA もしくは mRNA を基に調製することができる。

10 本方法においては、次いで、ブタ Mx1 遺伝子のエキソンであって配列番号：1 に記載の塩基配列における 2064 位～2074 位の塩基配列を含む DNA を単離する。該 DNA の単離は、ブタ Mx1 遺伝子の最終エキソンにハイブリダイズするプライマーを用いて、染色体 DNA、あるいは RNA を鋳型とした PCR 等によって行うことも可能である。本方法においては、次いで、単離した DNA の塩基配列を決定する。単離した DNA の塩基配列の決定は、当業者に公知の方法で行うことができる。

本方法においては、次いで、決定した DNA の塩基配列を、対照と比較する。本方法における対照とは、正常な(野生型)ブタ Mx1 遺伝子の配列(例えば、配列番号：1)を言う。

20 本発明の判定方法は、上記の如く直接被検ブタ由来の DNA の塩基配列を決定する方法以外に、上記「欠損」の検出が可能な種々の方法によって行うことができる。

例えば、本発明における上記「欠損」の検出は、以下のような方法によっても行うことができる。

25 まず、被検ブタから DNA 試料を調製する。次いで、調製した DNA 試料を制限酵素により切断する。次いで、DNA 断片をその大きさに応じて分離する。次いで、

- 13 -

検出された DNA 断片の大きさを、対照と比較する。また、他の一つの態様においては、まず、被検ブタから DNA 試料を調製する。次いで、ブタ Mx1 遺伝子のエキソンであって配列番号：1 に記載の塩基配列における 2064 位～2074 位の塩基配列を含む DNA を増幅する。さらに、増幅した DNA を制限酵素により切断する。次いで、DNA 断片をその大きさに応じて分離する。次いで、検出された DNA 断片の大きさを、対照と比較する。

このような方法としては、例えば、制限酵素断片長多型 (Restriction Fragment Length Polymorphism/RFLP) を利用した方法や PCR-RFLP 法等が挙げられる。具体的には、制限酵素の認識部位に変異（欠損）が存在する場合、制限酵素処理後に生じる断片の大きさが対照と比較して変化する。この変異を含む部分を PCR 法によって増幅し、それぞれの制限酵素で処理することによって、これらの変異を電気泳動後のバンドの移動度の差として検出することができる。あるいは、染色体 DNA をこれらの制限酵素によって処理し、電気泳動した後、本発明のプローブ DNA を用いてサザンプロッティングを行うことにより、変異の有無を検出することができる。用いられる制限酵素は、それぞれの変異に応じて適宜選択することができる。この方法では、ゲノム DNA 以外にも被検ブタから調製した RNA を逆転写酵素で cDNA にし、これをそのまま制限酵素で切断した後、サザンプロッティングを行うことも可能である。また、この cDNA を鋳型として PCR でブタ Mx1 遺伝子のエキソンであって配列番号：1 に記載の塩基配列における 2064 位～2074 位の塩基配列を含む DNA を増幅し、それを制限酵素で切断した後、移動度の差を調べることも可能である。

さらに別の方法においては、まず、被検ブタから DNA 試料を調製する。次いで、ブタ Mx1 遺伝子のエキソンであって配列番号：1 に記載の塩基配列における 2064 位～2074 位の塩基配列を含む DNA を増幅する。さらに、増幅した DNA を一本鎖 DNA に解離させる。次いで、解離させた一本鎖 DNA を非変性ゲル上で分離する。分離した一本鎖 DNA のゲル上での移動度を対照と比較する。

該方法としては、例えば PCR-SSCP (single-strand conformation polymorphism、一本鎖高次構造多型) 法 (Cloning and polymerase chain reaction-single-strand conformation polymorphism analysis of anonymous Alu repeats on chromosome

11. Genomics. 1992 Jan 1; 12 (1): 139-146.、Detection of p53 gene

5 mutations in human brain tumors by single-strand conformation polymorphism analysis of polymerase chain reaction products. Oncogene.

1991 Aug 1; 6 (8): 1313-1318.、Multiple fluorescence-based PCR-SSCP

analysis with postlabeling. 、PCR Methods Appl. 1995 Apr 1; 4 (5): 275-

282.) が挙げられる。この方法は操作が比較的簡便であり、また被検試料の量も少

10 なくて済む等の利点を有するため、特に多数の DNA 試料をスクリーニングするのに好適である。その原理は次の通りである。二本鎖 DNA 断片を一本鎖に解離すると、各鎖はその塩基配列に依存した独自の高次構造を形成する。この解離した

DNA 鎖を、変性剤を含まないポリアクリルアミドゲル中で電気泳動すると、それ

ぞれの高次構造の差に応じて、相補的な同じ鎖長の一本鎖 DNA が異なる位置に移

15 動する。一塩基の置換によってもこの一本鎖 DNA の高次構造は変化し、ポリアクリルアミドゲル電気泳動において異なる移動度を示す。従って、この移動度の変化を検出することにより DNA 断片に欠損等による変異が存在することを検出することができる。

具体的には、まず、ブタ Mx1 遺伝子のエキソンであって配列番号：1 に記載の

20 塩基配列における 2064 位～2074 位の塩基配列を含む DNA を PCR 法等によって增幅する。增幅される範囲としては、通常 200～400bp 程度の長さが好ましい。

PCR は、当業者においては反応条件等を適宜選択して行うことができる。PCR の際に、³²P 等のアイソトープ、蛍光色素、またはビオチン等によって標識したプライマーを用いることにより、增幅 DNA 産物を標識することができる。あるいは PCR

25 反応液に ³²P 等のアイソトープ、蛍光色素、またはビオチン等によって標識された基質塩基を加えて PCR を行うことにより、增幅 DNA 産物を標識することも可能で

ある。さらに、PCR 反応後にクレノウ酵素等を用いて、³²P 等のアイソトープ、蛍光色素、またはビオチン等によって標識された基質塩基を、増幅 DNA 断片に付加することによっても標識を行うことができる。こうして得られた標識 DNA 断片を、熱を加えること等により変性させ、尿素などの変性剤を含まないポリアクリルアミドゲルによって電気泳動を行う。この際、ポリアクリルアミドゲルに適量（5 から 10% 程度）のグリセロールを添加することにより、DNA 断片の分離の条件を改善することができる。また、泳動条件は各 DNA 断片の性質により変動するが、通常、室温（20 から 25℃）で行い、好ましい分離が得られないときには 4 から 30℃ までの温度で最適の移動度を与える温度の検討を行う。電気泳動後、DNA 断片の移動度を、X 線フィルムを用いたオートラジオグラフィーや、蛍光を検出するスキャナー等で検出し、解析を行う。移動度に差があるバンドが検出された場合、このバンドを直接ゲルから切り出し、PCR によって再度増幅し、それを直接シーケンシングすることにより、変異の存在を確認することができる。また、標識した DNA を使わない場合においても、電気泳動後のゲルをエチジウムプロマインドや銀染色法などによって染色することによって、バンドを検出することができる。

さらに別の方法は、まず、被検ブタから調製したブタ Mx1 遺伝子のエキソンであって配列番号：1 に記載の塩基配列における 2064 位～2074 位の塩基配列を含む DNA、および該 DNA とハイブリダイズするヌクレオチドプローブが固定された基板、を提供する。次いで、該 DNA と該基板を接触させる。さらに、基板に固定されたヌクレオチドプローブにハイブリダイズした DNA を検出することにより、上記「欠損」を検出する。

このような方法としては、DNA アレイ法が例示できる。被検ブタからのブタ Mx1 遺伝子のエキソンであって配列番号：1 に記載の塩基配列における 2064 位～2074 位の塩基配列を含む DNA 試料の調製は、当業者に周知の方法で行うことできる。該 DNA 試料の調製の好ましい態様においては、例えば被検ブタの血液、

皮膚、口腔粘膜等の組織または細胞から抽出した染色体 DNA を基に調製することができる。染色体 DNA から本方法の DNA 試料を調製するには、例えばブタ Mx1 遺伝子のエキソンであって配列番号：1 に記載の塩基配列における 2064 位～2074 位の塩基配列を含む DNA にハイブリダイズするプライマーを用いて、染色体 DNA を鋳型とした PCR 等によってブタ Mx1 遺伝子のエキソンであって配列番号：1 に記載の塩基配列における 2064 位～2074 位の塩基配列を含む DNA を調製することも可能である。調製した DNA 試料には、必要に応じて、当業者に周知の方法によって検出のための標識を施すことができる。

本発明において「基板」とは、ヌクレオチドを固定することが可能な板状の材料を意味する。本発明においてヌクレオチドには、オリゴヌクレオチドおよびポリヌクレオチドが含まれる。本発明の基板は、ヌクレオチドを固定することが可能であれば特に制限はないが、一般に DNA アレイ技術で使用される基板を好適に用いることができる。

一般に DNA アレイは、高密度に基板にプリントされた何千ものヌクレオチドで構成されている。通常これらの DNA は非透過性 (non-porous) の基板の表層にプリントされる。基板の表層は、一般的にはガラスであるが、透過性 (porous) の膜、例えばニトロセルロースメンブレムを使用することができる。

本発明において、ヌクレオチドの固定（アレイ）方法として、Affymetrix 社開発によるオリゴヌクレオチドを基本としたアレイが例示できる。オリゴヌクレオチドのアレイにおいて、オリゴヌクレオチドは通常インサイチュ (*in situ*) で合成される。例えば、photolithographic の技術 (Affymetrix 社)、および化学物質を固定させるためのインクジェット (Rosetta Inpharmatics 社) 技術等によるオリゴヌクレオチドのインサイチュ合成法が既に知られており、いずれの技術も本発明の基板の作製に利用することができる。

基板に固定するヌクレオチドプローブは、上記「欠損」を検出することができるものであれば、特に制限されない。即ち該プローブは、例えば、野生型のブタ

Mx1 遺伝子のエキソンであって配列番号：1 に記載の塩基配列における 2064 位～2074 位の塩基配列を含む DNA、あるいはブタ Mx1 遺伝子のエキソンであって配列番号：1 に記載の塩基配列における 2064 位～2074 位の塩基配列が欠損した DNA と特異的にハイブリダイズするようなプローブである。特異的な

5 ハイブリダイズが可能であれば、ヌクレオチドプローブは、検出するブタ Mx1 遺伝子のエキソンであって配列番号：1 に記載の塩基配列における 2064 位～2074 位の塩基配列を含む DNA、またはブタ Mx1 遺伝子のエキソンであって配列番号：1 に記載の塩基配列における 2064 位～2074 位の塩基配列が欠損した DNA に対し、完全に相補的である必要はない。

10 本発明において基板に結合させるヌクレオチドプローブの長さは、オリゴヌクレオチドを固定する場合は、通常 10～100 ベースであり、好ましくは 10～50 ベースであり、さらに好ましくは 15～25 ベースである。

本発明においては、次いで、該 cDNA 試料と該基板を接触させる。本工程により、上記ヌクレオチドプローブに対し、DNA 試料をハイブリダイズさせる。ハイブリダイゼーションの反応液および反応条件は、基板に固定するヌクレオチドプローブの長さ等の諸要因により変動しうるが、一般的に当業者に周知の方法により行うことができる。

本発明においては、次いで、該 DNA 試料と基板に固定されたヌクレオチドプローブとのハイブリダイズの有無または強度を検出する。この検出は、例えば、蛍光シグナルをスキャナー等によって読み取ることによって行うことができる。尚、DNA アレイにおいては、一般的にスライドガラスに固定した DNA をプローブといい、一方溶液中のラベルした DNA をターゲットという。従って、基板に固定された上記ヌクレオチドを、本明細書においてヌクレオチドプローブと記載する。

上記の方法以外にも、特定位置の欠損のみを検出する目的にはアレル特異的オリゴヌクレオチド (Allele Specific Oligonucleotide/ASO) ハイブリダイゼーション法が利用できる。変異 (欠損) が存在すると考えられる塩基配列を含むオ

リゴヌクレオチドを作製し、これと試料 DNA でハイブリダイゼーションを行わせると、変異が存在する場合、ハイブリッド形成の効率が低下する。それをサザンプロット法や、特殊な蛍光試薬がハイブリッドのギャップにインターラーチョンすることにより消光する性質を利用した方法、等により検出することができる。

5 また、リボヌクレアーゼ A ミスマッチ切断法による検出も可能である。具体的には、ブタ Mx1 遺伝子のエキソンであって配列番号：1 に記載の塩基配列における 2064 位～2074 位の塩基配列を含む DNA を PCR 法等によって増幅し、これをプラスミドベクター等に組み込んだ Mx1 遺伝子最終エキソン cDNA 等から調製した標識 RNA とハイブリダイゼーションを行う。変異が存在する部分においてはハイ
10 ブリッドが一本鎖構造となるので、この部分をリボヌクレアーゼ A によって切断し、これをオートラジオグラフィー等で検出することによって変異の存在を検出することができる。

さらに別の方法においては、まず、被検ブタから DNA を調製し、次いで、ブタ Mx1 遺伝子のエキソンであって配列番号：1 に記載の塩基配列における 2064 位～2074 位の塩基配列を含む DNA を増幅する。次いで、増幅した DNA を質量分析器にかけ、分子量を測定する。次いで、測定した分子量を対照と比較する。このような方法としては、例えば、MALDI-TOF MS 法 (Trends Biotechnol (2000) : 18:77-84) 等が挙げられる。

本発明の上記検査方法の別の態様は、ブタ Mx1 遺伝子の最終エキソンの発現産物を指標とすることによって検査を行う方法である。ここで「発現」とは、転写および翻訳が含まれる。従って、「発現産物」には、mRNA およびタンパク質が含まれる。

本発明は、ブタ Mx1 遺伝子の最終エキソンの発現産物を検出することを特徴とする、RNA ウィルス（例えば、インフルエンザウィルス、PRRS 原因ウィルス等）
25 抵抗性のブタを判定する方法を提供する。該方法の好ましい態様においては、まず、被検ブタからタンパク質試料を調製し、該タンパク質試料に含まれる、ブタ

- 1 9 -

Mx1 遺伝子のエキソンであって配列番号：1 に記載の塩基配列における 2064 位～2074 位の 11bp が欠損した塩基配列によってコードされるブタ Mx1 変異タンパク質の量を測定する。

このような方法としては、SDS ポリアクリルアミド電気泳動法、並びにブタ Mx1 5 遺伝子のエキソンであって配列番号：1 に記載の塩基配列における 2064 位～2074 位の 11bp が欠損した塩基配列によってコードされるブタ Mx1 変異タンパク質を認識する抗体を用いた、ウェスタンプロッティング法、ドットプロッティング法、免疫沈降法、酵素結合免疫測定法 (ELISA)、および免疫蛍光法を例示することができる。

10 上記の方法によって、ブタ Mx1 遺伝子のエキソンであって配列番号：1 に記載の塩基配列における 2064 位～2074 位の 11bp が欠損した塩基配列によってコードされるブタ Mx1 変異タンパク質が検出された場合に、被検ブタは RNA ウィルス（例えば、インフルエンザウィルス、PRRS 原因ウィルス等）非抵抗性であるものと判定される。一方、上記変異タンパク質が検出されない場合に、被検ブタ 15 は RNA ウィルス（例えば、インフルエンザウィルス、PRRS 原因ウィルス等）抵抗性であるものと判定される。

以上、種々の検出方法を例示したが、これらに特に限定されるものではない。

本発明はまた、本発明の RNA ウィルス（例えば、インフルエンザウィルス、PRRS 原因ウィルス等）抵抗性のブタを判定する方法に用いるための判定用試薬を 20 提供する。

その一つの態様は、ブタ Mx1 遺伝子のエキソンであって配列番号：1 に記載の塩基配列における 2064 位～2074 位の塩基配列を含む DNA 領域、または 2064 位～2074 位が欠損した塩基配列を含む DNA 領域とハイブリダイズし、少なくとも 15 ヌクレオチドの鎖長を有するオリゴヌクレオチドを含む、判定試薬である。

該オリゴヌクレオチドは、ブタ Mx1 遺伝子のエキソンであって配列番号：1 に

- 2 0 -

記載の塩基配列における 2064 位～2074 位の塩基配列を含む DNA 領域、または 2064 位～2074 位が欠損した塩基配列を含む DNA 領域に特異的にハイブリダイズするものである。ここで「特異的にハイブリダイズする」とは、通常のハイブリダイゼーション条件下、好ましくはストリングエントなハイブリダイ

5 ゼーション条件下（例えば、サムブルックら, Molecular Cloning, Cold Spring Harbour Laboratory Press, New York, USA, 第 2 版 1989 に記載の条件）において、他のタンパク質をコードする DNA とクロスハイブリダイゼーションを有意に生じないことを意味する。特異的なハイブリダイズが可能であれば、該オリゴヌクレオチドは、検出する上記塩基配列に対し、完全に相補的である必要はない。

10 該オリゴヌクレオチドは、本発明の判定方法におけるプローブやプライマーとして用いることができる。該オリゴヌクレオチドをプライマーとして用いる場合、その長さは、通常 15bp～100bp であり、好ましくは 17bp～30bp である。プライマーは、ブタ Mx1 遺伝子のエキソンであって配列番号：1 に記載の塩基配列における 2064 位～2074 位の塩基配列を含む DNA 領域を增幅しうるものであれば、特に制限されない。該プライマーとしては、例えば、後述の実施例に記載された配列番号：9 または 10 で示される配列からなるオリゴヌクレオチドが挙げられるが、このオリゴヌクレオチドに特に限定されるものではない。

また、本発明のオリゴヌクレオチドをプローブとして使用する場合、該プローブは、ブタ Mx1 遺伝子のエキソンであって配列番号：1 に記載の塩基配列における 2064 位～2074 位の塩基配列を含む DNA 領域、または 2064 位～2074 位が欠損した塩基配列を含む DNA 領域の少なくとも一部に特異的にハイブリダイズするものであれば、特に制限されない。該プローブは、合成オリゴヌクレオチドであってもよく、通常少なくとも 15bp 以上の鎖長を有する。

本発明のオリゴヌクレオチドは、例えば市販のオリゴヌクレオチド合成機により作製することができる。プローブは、制限酵素処理等によって取得される二本鎖 DNA 断片として作製することもできる。

- 21 -

本発明のオリゴヌクレオチドをプローブとして用いる場合は、適宜標識して用いることが好ましい。標識する方法としては、T4 ポリヌクレオチドキナーゼを用いて、オリゴヌクレオチドの 5' 端を ^{32}P でリン酸化することにより標識する方法、およびクレノウ酵素等の DNA ポリメラーゼを用い、ランダムヘキサマーオリゴヌクレオチド等をプライマーとして ^{32}P 等のアイソトープ、蛍光色素、またはビオチン等によって標識された基質塩基を取り込ませる方法（ランダムプライム法等）を例示することができる。

本発明の検査薬の他の一つの態様は、ブタ Mx1 遺伝子のエキソンであって配列番号：1 に記載の塩基配列における 2064 位～2074 位の 11bp が欠損した塩基配列によってコードされるブタ Mx1 変異タンパク質を認識する抗体を含む、判定試薬である。該抗体は、本発明の方法に用いることが可能な抗体であれば、特に制限はないが、例えばポリクローナル抗体やモノクローナル抗体が挙げられる。抗体は必要に応じて標識される。

ブタ Mx1 遺伝子のエキソンであって配列番号：1 に記載の塩基配列における 2064 位～2074 位の 11bp が欠損した塩基配列によってコードされるブタ Mx1 変異タンパク質を認識する抗体は、当業者に公知の方法により調製することができる。ポリクローナル抗体であれば、例えば、次のようにして取得することができる。ブタ Mx1 変異タンパク質、あるいは GST との融合タンパク質として大腸菌等の微生物において発現させたりコンビナントブタ Mx1 変異タンパク質、またはその部分ペプチドをウサギ等の小動物に免疫し血清を得る。これを、例えば、硫酸沈殿、プロテイン A、プロテイン G カラム、DEAE イオン交換クロマトグラフィー、ブタ Mx1 変異タンパク質や合成ペプチドをカップリングしたアフィニティーカラム等により精製することにより調製する。また、モノクローナル抗体であれば、例えば、ブタ Mx1 変異タンパク質若しくはその部分ペプチドをマウスなどの小動物に免疫を行い、同マウスより脾臓を摘出し、これをすりつぶして細胞を分離し、該細胞とマウスミエローマ細胞とをポリエチレングリコールなどの試薬

- 22 -

を用いて融合させ、これによりできた融合細胞（ハイブリドーマ）の中から、ブタ Mx1 変異タンパク質に結合する抗体を産生するクローンを選択する。次いで、得られたハイブリドーマをマウス腹腔内に移植し、同マウスより腹水を回収し、得られたモノクローナル抗体を、例えば、硫酸沈殿、プロテイン A、プロテイン G カラム、DEAE イオン交換クロマトグラフィー、ブタ Mx1 変異タンパク質や合成ペプチドをカップリングしたアフィニティーカラム等により精製することで、調製することが可能である。

上記の判定試薬においては、有効成分であるオリゴヌクレオチドや抗体以外に、例えば、滅菌水、生理食塩水、植物油、界面活性剤、脂質、溶解補助剤、緩衝剤、タンパク質安定剤（BSA やゼラチンなど）、保存剤等が必要に応じて混合されていてもよい。

図面の簡単な説明

図 1 は、肥育生産用の 3 元交雑豚の写真である。

図 2 は、MOI 1 における、Mx1 遺伝子型とウイルス抑制能との関係を示すグラフである。

図 3 は、MOI 10 における、Mx1 遺伝子型とウイルス抑制能との関係を示すグラフである。

図 4 は、3T3 細胞、及び 3T3-0、3T3-3、3T3-11 の各形質転換細胞における Mx1 の発現量の比較を、RT-PCR によって行った結果を示す写真である。

図 5 は、ブタ Mx1 遺伝子最終エキソンにおける「11bp の欠損」領域、および該領域を增幅するためのプライマーセットの塩基配列を示す図である。

図 6 は、PCR 増幅によるブタ Mx1 遺伝子の最終エキソンにおける 11 塩基欠損の検出を示す写真である。

以下、本発明を実施例によりさらに具体的に説明するが本発明はこれら実施例に制限されるものではない。

5 プタ品種 Meishan と Landrace で判明した Mx1 遺伝子における変異は、その発現タンパク質の機能に影響があるのか否かを検討した。

10 具体的には、正常及び変異のある Mx1 遺伝子を強制発現させた細胞を用い、インフルエンザウイルス (Influenza virus) による感染実験を行い、Mx1 遺伝子の変異が感染防御機能に影響を及ぼすか否かを検証した。

〔実施例 1〕 Meishan と Landrace の正常型と変異型の Mx1 遺伝子の cDNA クローニング

15 Meishan 39 頭、Landrace 36 頭より EDTA 血 5 ml を採取し、RPMI1640 (GIBCO) 培地で 2 倍に希釈し、Ficoll-Paque (Pharmacia Biotech) に重層後、400 x g で 40 分間遠心を行い、リンパ球層を分離・採取し、phosphate buffered saline (PBS) で 3 回洗浄し、リンパ球を調製した。これらのリンパ球の DNAZol Reagent (G 20 IBCO) 処理により DNA を精製した。これらの DNA を鋳型に、Meishan はエキソン 13 をプライマー対 (5'-CTGAAAGATCTGGCTATGGAGG-3' / 配列番号：3、5'-AAGAACG TGAGACGTCGATCCGGCT-3' / 配列番号：4) で、Landrace は最終エキソンをプライマー対 (5'-AAGCGCATCTCCAGCCACATC-3' / 配列番号：5、5'-AAGACATTGGCGTGAAAG G-3' / 配列番号：6) で、それぞれ PCR (94°C 5 分間、94°C 30 秒、55°C 30 秒、7 25 2°C 1 分を 40 サイクル、72°C 5 分) により増幅した。エキソン 13 はダイレクトシーケンスにより変異の有無を判定した。最終エキソンは *Nal* I の 37°C 2 時間処理による RFLP で変異の検出を行った。

25 正常型と変異型を同定した個体より、20ml の EDTA 血を採取し、リンパ球を調製、10% 子牛血清 (FBS) 加 RPMI 1640 培地に浮遊させ、一晩 37°C、炭酸ガス培養器で培養した後、ヒト IFN α (Calbiochem) 500U で 3 時間処理し、処理リンパ球より RNA を精製した。この RNA を鋳型にし、プライマー対 attB1mxF (5'-

- 24 -

GGGGACAAGTTGTACAAAAAGCAGGCTGTACAGCGTCA AAGAAAAGGAAG-3' / 配列番号: 7),
attB2mxR (5' -GGGGACCACTTGTCACAAGAAAGCTGGGTCTTCTATGATGCTATGCGG-3' / 配列番
号: 8) を用い、RT-PCR で Mx1 遺伝子を増幅した。この PCR 産物を Gateway
Cloning Technology (GIBCO) のベクター pDONR201 と混合後、BP Clonase
5 (GIBCO) 処理を 25°C で 1 時間行った。この BP 反応液をコンピテントセル DH5 α に
型どおりトランスフォームし、選択はカナマイシン (kanamycin) を 50 μ g/ml 含
有の LB 培地 (plates) で行った。各クローンのインサートの確認は、attB1mx-F
及び attB2mx-R を用い、コロニーPCR (94°C 2 分間、94°C 30 秒、64°C 30 秒、72°C
3 分を 30 サイクル、72°C 5 分) を行い、この PCR 産物のダイレクトシークエンス
10 により行った。正常 Mx1 遺伝子の cDNA クローンを pEntmx1、Meishan 型を
pEntmx1-3、Landrace 型を pEntmx1-11 とした。

[実施例 2] 各 Mx1 遺伝子の発現ベクターの構築

pEntmx1、pEntmx1-3、pEntmx1-11 の組み換え体クローンを、それぞれ 15ml の
15 LB 培地に移植し、37°C、一晩振とう培養後、アルカリ法によりプラスミド DNA を
精製した。これらプラスミド DNA と pDEST12.2 (GIBCO) を混合し、LR Clonase
(GIBCO) で 25°C、60 分処理を行った後、DH5 α コンピテントセルにトランスフォ
ームし、100 μ g/ml のアンピシリン含有の LB 培地で選択を行った。各組み換え体
クローンよりプラスミド DNA を精製し、pExmx1、pExmx1-3、pExmx1-11 とした。
20 インサートの確認は、attB1mx-F 及び attBmx-R を用いたコロニーPCR 産物のダイ
レクトシークエンスにより行った。

[実施例 3] 各 Mx1 遺伝子による形質転換体の構築

NIH3T3 細胞の継代維持は、7% FBS 加 Dulbecco's modified MEM (DMEM、GIBCO)
25 で行った。pExmx1、pExmx1-3、pExmx1-11 を 5 μ g づつ、および 4 x 10⁶/0.4ml の
3T3 細胞と混合し、2mm 幅のキュベットに入れ、100 μ F、13 ohm、200v、1kv/cm

- 25 -

でエレクトロポレーションを行った。各細胞は4日間培養後、G418 (Geneticin, GIBCO) を500 μg/ml の濃度で加えた DMEM で培養し、形質転換体の選択を行った。pExmx1 による形質転換体を 3T3-0、pExmx1-3 による形質転換体を 3T3-3、pExmx 1-11 による形質転換体を 3T3-11 とした。

5

〔実施例4〕 インフルエンザウイルスの調製

インフルエンザウイルス (Aichi, H2N2) は卵令11日のSPF卵の尿液腔内に接種し、37°Cで2日間培養した後、一晩4°Cに静置してから尿液を採取した。尿液を、3500 rpmで20分間遠心し、その上清を種ウイルス液とし分注後、-80°Cで保存した。種ウイルスの力価は、10 7.5 EID₅₀ (50% Egg-Infective Dose) /0.2ml であった。

〔実施例5〕 インフルエンザウイルスの感染実験

各 Mx1 遺伝子の強制発現によりウイルスの増殖に影響があるのか否かの検討を、15 感染させるウイルス量を変えて行った。

3T3、3T3-0、3T3-3、3T3-11をそれぞれ細胞濃度 5×10^4 /ml に調製し、24-well plate に 1ml/well で植え込み、37°Cの炭酸ガスふらん器で2日間培養した。各細胞を Phosphate buffered saline (PBS) で1回洗浄後、PBS で種ウイルスを 10 倍希釈 (MOI:multiplicity of Infection 10 に相当) 及び 100 倍希釈 (MOI 1 20 に相当) したウイルス液を接種し、37°Cで1時間吸着を行った。未吸着ウイルスは PBS で2回細胞面を洗浄し除去した後、DMEM を 2 ml 加え培養した。採材は、0、6、12、18、24、30、36、48、54 時間後に行い、採取した培養上清を 2500 rpm で 5 分間遠心し、その上清を力価測定まで-80°Cに保存した。

経時的に採取した上清中のウイルスの力価測定は、PBS でそれぞれ 10 倍段階希釈したウイルス液を各希釈について 2 個の 11 日卵に、0.2 ml ずつ尿液腔内接種をし、2 日間培養後、一晩4°Cに静置し、その尿液のニワトリ赤血球凝集能の有

無により判定した。

その結果、MOI 1 の場合、3T3、3T3-11 においては、ウイルス感染後 18 時間より培養上清中に増殖ウイルスの放出が認められ、ピークは 36 時間後で 2.8-3.0 EID₅₀/0.2 ml のウイルス増殖が認められた。一方、3T3-0 及び 3T3-3 では、36~48 時間後に 1.0 EID₅₀/0.2 ml のウイルス増殖が認められたが、それ以上の増殖は認められず、3T3、3T3-11 におけるウイルス増殖と明らかな差が観察された（図 2）。

MOI 10 の場合、3T3、3T3-11 においては、ウイルス感染 12 時間後より培養上清中に 0.3-0.5 EID₅₀/0.2 ml の感染性ウイルスが検出され、36 時間後には 4.5-4.7 EID₅₀/0.2 ml の最大増殖が認められた。3T3-0 及び 3T3-3 では、24 時間後に 0.5 EID₅₀/0.2 ml、48 時間後に 2.7-2.8 EID₅₀/0.2 ml の感染性ウイルスが検出されたが、やはりそれ以上の増殖は認められず、明らかにウイルスの増殖が抑制された（図 3）。

インフルエンザウイルスは RNA ウイルスであるので、各 3T3 細胞に感染させたことによりマウス IFN α が産生され、ウイルスの増殖に影響を与える可能性がある。そこで、各 3T3 細胞を抗マウス IFN α を加えた培地で 12 日間継代維持した後、MOI 10 でのウイルス感染実験を行った。採材は 36 時間後に行い、培養上清中のウイルス力価測定をした結果、抗マウス IFN α を処理していない細胞群と同様のウイルス増殖結果を得た。このことより、ウイルスの増殖に影響を与えた因子は、導入したブタ Mx1 遺伝子であると考察された。

〔実施例 6〕 各形質転換細胞における Mx1 の発現量の比較検討

各細胞におけるウイルス増殖の差が、Mx1 の発現を反映したものであるのか否か検討するため、感染に用いた各細胞の RNA を用い、RT-PCR を行った。

3T3、3T3-3、3T3-11 をそれぞれ細胞濃度 $2 \times 10^6/\text{ml}$ に調製し、RNA を抽出・精製し、RT-PCR により Mx1 の発現量を測定した。用いたプライマー対は、attB1mxF、

- 27 -

attB2mxR で、反応条件は 55°C・30 分、94°C・2 分の後、94°C・15 秒、58°C・30 秒、68°C・3 分を 40 サイクル行った後、72°C・5 分の伸長をした。定量のための外部標準に、マウス G3HPD (TOYOB0) を増幅し発現量の陽性コントロールとした。陰性コントロールは、鑄型 DNA の代わりに蒸留水をえたものとした。

5 その結果、3T3 ではブタ Mx1 の発現はなく (図 4、レーン 1)、3T3-0、3T3-11、3T3-3 では、3T3-11 においてやや発現量が多い傾向が認められたが、それぞれにおいてブタ Mx1 の発現が認められた (図 4、レーン 3、4、5)。内部標準のマウス G3PDH の発現量より、各細胞間で採材した細胞数に大きな差はなく、3T3-0、3T3-11、3T3-3 では、ほぼ等量のそれぞれの Mx1 タンパク質が産生されているこ
10 とが示唆された。

〔実施例 7〕 PCR 増幅によるブタ Mx1 遺伝子最終エキソンにおける 11 塩基欠損の検出

15 以下のプライマーセットを用いて、被検ブタについて PCR を行った。増幅部分は、PubMed アクセッション番号 M65087 の配列における 1981 位～2160 位である (図 5)。

- ・プライマー F: 5'- AGT GAC AGG AGC GAC AAG AG -3' (配列番号: 9)
- ・プライマー R: 5'- CCT GGA GAG TCC GGT TCA -3' (配列番号: 10)

PCR の条件は、1) 94°C・10 分; 2) 94°C・30 秒、60°C・30 秒、72°C・1 分; 20 3) 72°C・5 分である。次いで、PCR 産物 2 マイクロリットルを 6 %PAGE、200 V で 1 時間電気泳動し、銀染色を行った (図 6)。PCR 産物は野生型の場合は、105 bp あり、11bp の欠損を含む場合は 94bp である。サイズマーカーは、fX174/Hae III を用いた。

25 図 6 で示すように、上記のプライマーセットを用いた PCR により、11bp の欠損を検出することができた。

産業上の利用の可能性

世界中で広く用いられている家畜豚の中には、ウイルス抑制能を持たない 11 塩基欠損型の Mx1 遺伝子を保有している個体がいる。このような個体は RNA ウィルスの侵害に対する初期防衛能に大きな問題があると予想される。

5

[遺伝的抗病性能力測定技術の簡易化]

これらのブタ集団からウイルス抑制能を持つ野生型遺伝子を保有する個体を、ブタの血液、肉片、毛根等 DNA を含む組織を少量採取し、その DNA 抽出物から本発明対象である Mx1 遺伝子型を調べることにより、選抜することができる。ある 10 いは、望ましくない遺伝子型を保有する個体を淘汰することができる。

[ブタの生産性向上]

本発明により、インフルエンザウイルス、PRRS 原因ウイルス等を含む RNA ウィルス由来の疾病に対する、遺伝的抗病性の強弱を知ることができる。このこと 15 により生産により望ましい健常な個体が選抜できる。また、子豚の呼吸器病罹患率が低下し、生存率、成長率が上昇する。

[ヒトに対して]

インフルエンザ増殖抑制能の弱いブタ個体の群はインフルエンザに感染しやすく、ブタ群が死滅しない場合には、インフルエンザウイルスは遺伝的変異を伴いながら、時には新種のインフルエンザウイルスとなり増殖する。1917 から 1918 年に流行し、世界で 4 千万人以上、国内だけでも 30 万人以上の命を奪ったスペイン風邪のインフルエンザウイルスのように、新種のインフルエンザウイルスはヒトへと感染するならば甚大な被害をもたらす。本発明によって、インフルエンザ 25 ウィルス増殖抑制能の高いブタが選抜されることにより、ブタ群内でのインフルエンザウイルス増殖が抑制され新種インフルエンザウイルス発生の可能性が低下

- 2 9 -

し、人類への脅威の1つを回避する可能性が高くなる。

- 3 0 -

請求の範囲

1. RNA ウィルス抵抗性のブタを判定する方法であって、ブタ Mx1 遺伝子のエキソン上の配列番号：1 に記載の塩基配列における 2064 位～2074 位の 11bp の欠損を検出することを含む方法。

5 2. 以下の (a)～(c) の工程を含む、請求項 1 に記載の判定方法。

(a) 被検ブタから DNA を調製する工程

(b) ブタ Mx1 遺伝子のエキソンであって配列番号：1 に記載の塩基配列における 2064 位～2074 位の塩基配列を含む DNA を増幅する工程

10 (c) 増幅した DNA の塩基配列を決定する工程

3. 以下の (a)～(d) の工程を含む、請求項 1 に記載の判定方法。

(a) 被検ブタから DNA を調製する工程

(b) 調製した DNA を制限酵素により切断する工程

(c) DNA 断片をその大きさに応じて分離する工程

15 (d) 検出された DNA 断片の大きさを対照と比較する工程

4. 以下の (a)～(e) の工程を含む、請求項 1 に記載の判定方法。

(a) 被検ブタから DNA を調製する工程

(b) ブタ Mx1 遺伝子のエキソンであって配列番号：1 に記載の塩基配列における 2064 位～2074 位の塩基配列を含む DNA を増幅する工程

20 (c) 増幅した DNA を制限酵素により切断する工程

(d) DNA 断片をその大きさに応じて分離する工程

(e) 検出された DNA 断片の大きさを対照と比較する工程

5. 以下の (a)～(e) の工程を含む、請求項 1 に記載の判定方法。

(a) 被検ブタから DNA を調製する工程

25 (b) ブタ Mx1 遺伝子のエキソンであって配列番号：1 に記載の塩基配列における 2064 位～2074 位の塩基配列を含む DNA を増幅する工程

- 31 -

- (c) 増幅した DNA を一本鎖に解離させる工程
- (d) 解離させた一本鎖 DNA を非変性ゲル上で分離する工程
- (e) 分離した一本鎖 DNA のゲル上での移動度を対照と比較する工程

6. 以下の (a) ~ (d) の工程を含む、請求項 1 に記載の判定方法。

- 5 (a) 被検ブタから DNA を調製する工程
- (b) ブタ Mx1 遺伝子のエキソンであって配列番号：1 に記載の塩基配列における 2064 位～2074 位の塩基配列を含む DNA を増幅する工程
- (c) 工程 (b) で増幅した DNA を質量分析器にかけ、分子量を測定する工程

10 (d) 工程 (c) で測定した分子量を対照と比較する工程

7. 以下の (a) ~ (f) の工程を含む、請求項 1 に記載の判定方法。

- (a) 被検ブタから DNA を調製する工程
- (b) ブタ Mx1 遺伝子のエキソンであって配列番号：1 に記載の塩基配列における 2064 位～2074 位の塩基配列を含む DNA を増幅する工程
- 15 (c) ヌクレオチドプローブが固定された基板を提供する工程
- (d) 工程 (b) の DNA と工程 (c) の基板を接触させる工程
- (e) 該 DNA と該基板に固定されたヌクレオチドプローブとのハイブリダイズの強度を検出する工程
- (f) 工程 (e) で検出された強度を対照と比較する工程

20 8. 以下の (a) および (b) の工程を含む、請求項 1 に記載の判定方法。

- (a) 被検ブタからタンパク質試料を調製する工程
- (b) 該タンパク質試料に含まれる、ブタ Mx1 遺伝子のエキソンであって配列番号：1 に記載の塩基配列における 2064 位～2074 位の 11bp が欠損した塩基配列によってコードされるブタ Mx1 変異タンパク質の量を測定する工程

25 9. 前記 11bp の欠損が検出された場合に被検ブタは RNA ウィルスに感受性である

- 3 2 -

ものと判定され、検出されない場合に被検ブタはRNAウイルスに抵抗性であるものと判定される工程、をさらに含む請求項1～8のいずれかに記載の判定方法。

10. RNAウイルスがインフルエンザウイルス、またはPRRS原因ウイルスである
5 請求項1～9のいずれかに記載の方法。

11. 請求項1～10のいずれかに記載の判定方法のためのPCRプライマーであ
って、ブタMx1遺伝子のエキソンであって配列番号：1に記載の塩基配列
における2064位～2074位の塩基配列を含むDNA領域を増幅するため
のオリゴヌクレオチド。

10 12. ブタMx1遺伝子のエキソンであって配列番号：1に記載の塩基配列にお
ける2064位～2074位の塩基配列を含むDNA領域、または2064
位～2074位が欠損した塩基配列を含むDNA領域とハイブリダイズし、
少なくとも15ヌクレオチドの鎖長を有するオリゴヌクレオチド。

13. ブタMx1遺伝子のエキソンであって配列番号：1に記載の塩基配列にお
ける2064位～2074位の11bpが欠損した塩基配列によってコードさ
れるブタMx1変異タンパク質を認識する抗体。

14. 請求項11もしくは12に記載のオリゴヌクレオチド、または請求項1
3に記載の抗体を含む、RNAウイルス抵抗性ブタの判定用試薬。

15. RNAウイルスがインフルエンザウイルス、またはPRRS原因ウイルスであ
る、請求項14に記載の判定用試薬。

1 / 6

図 1

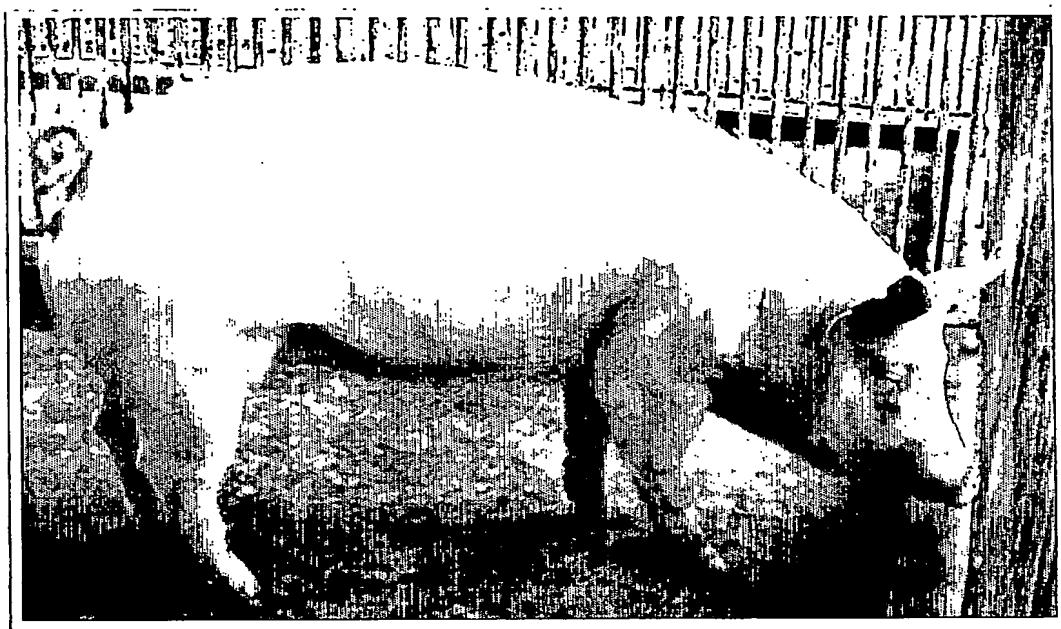


図 2

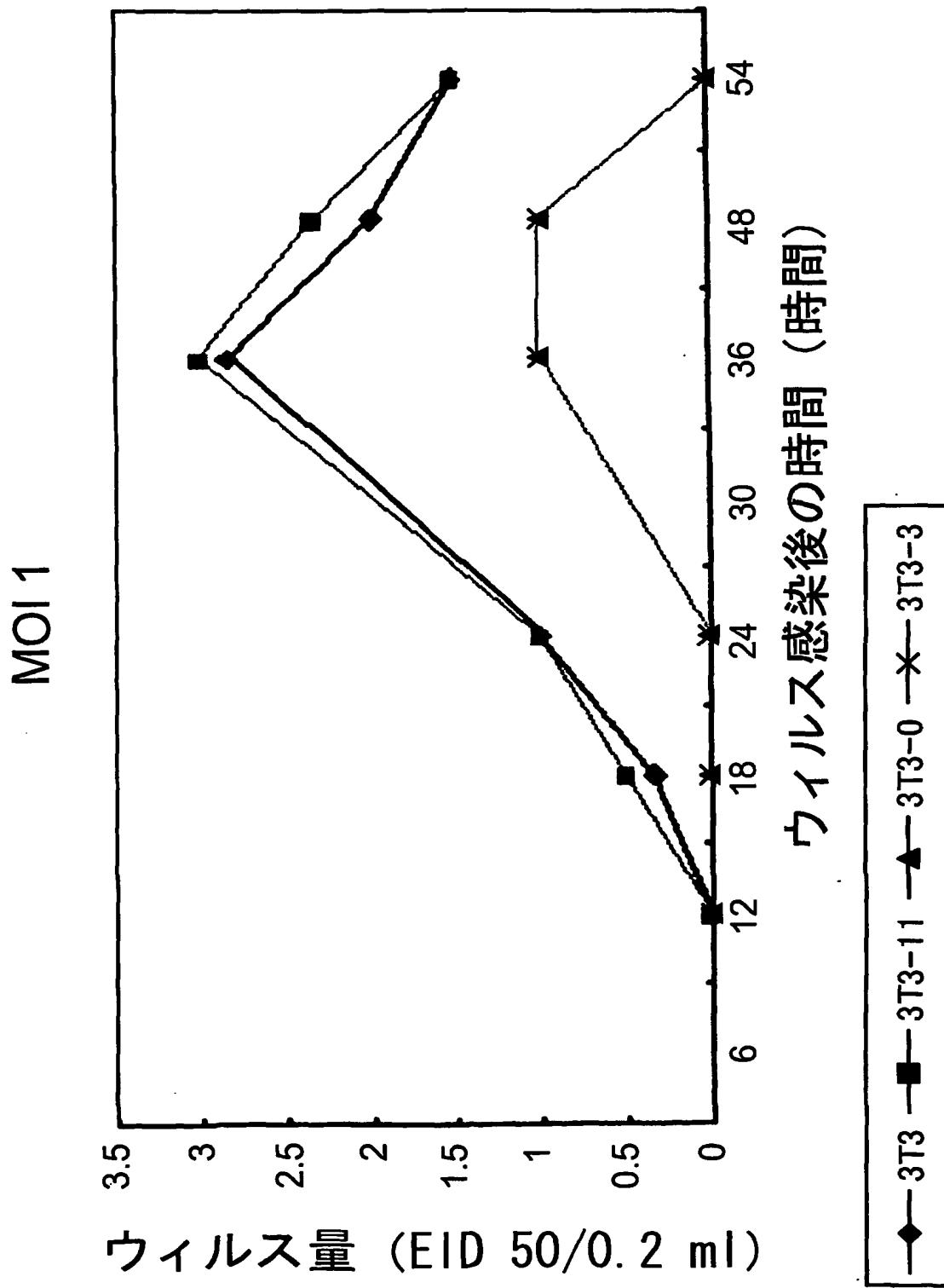
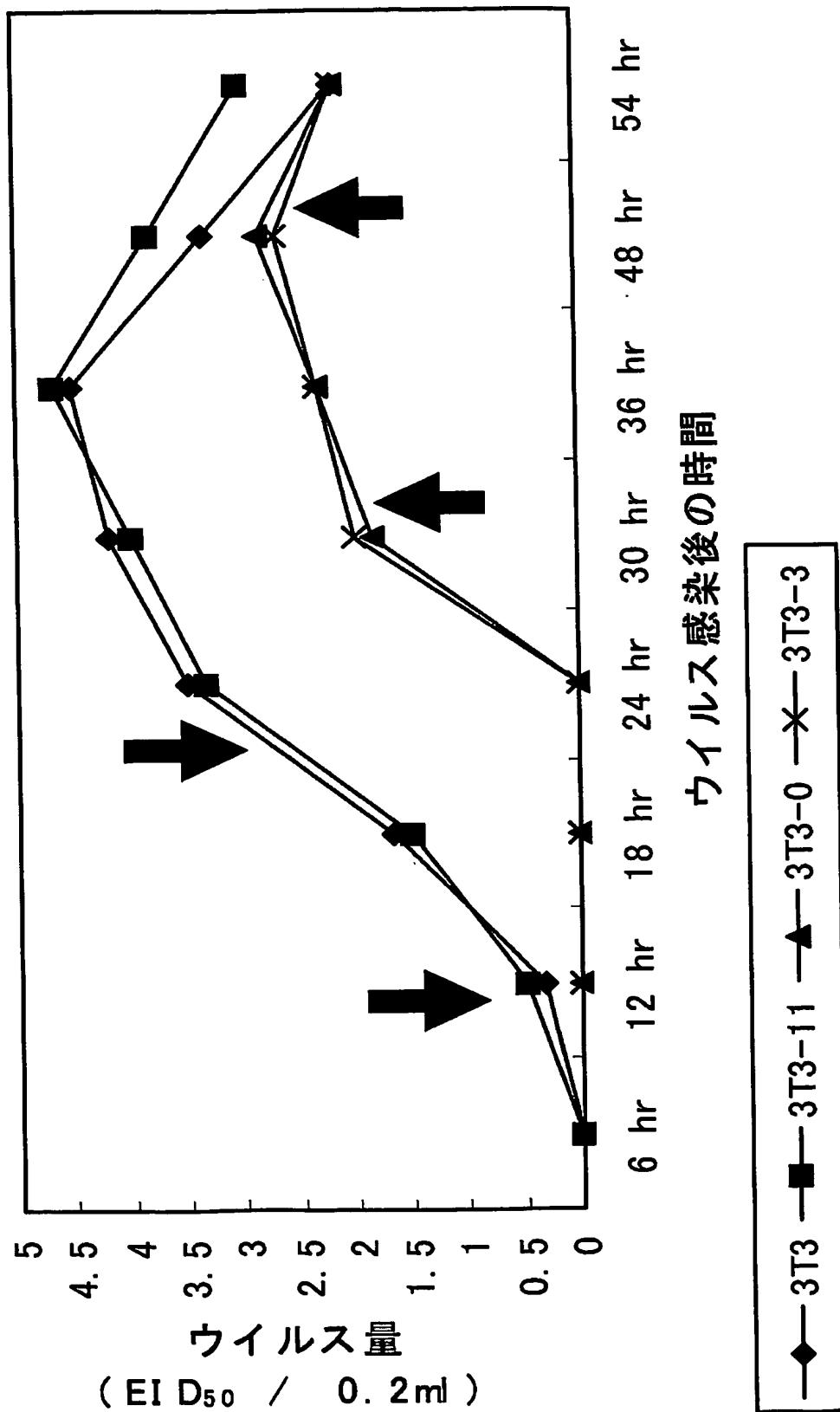


図 3



4 / 6

図 4

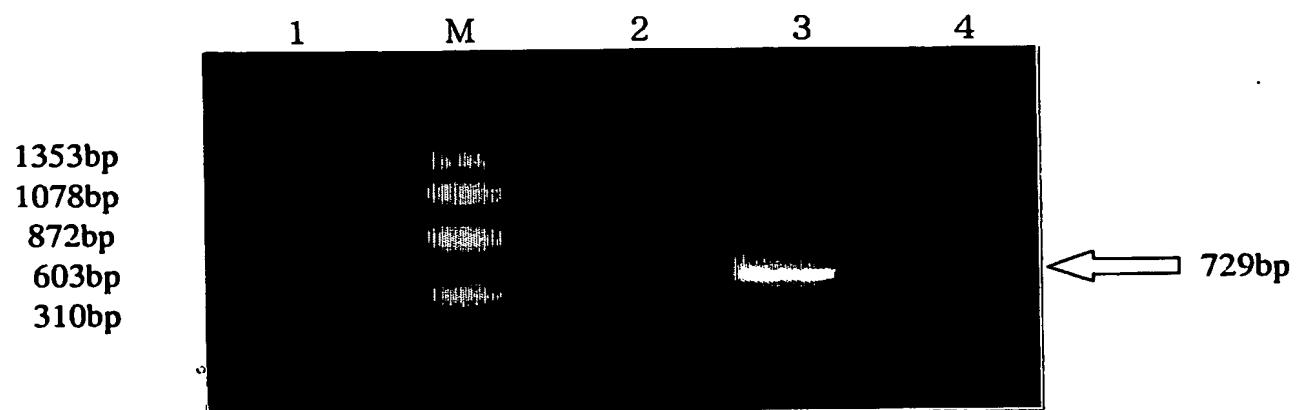
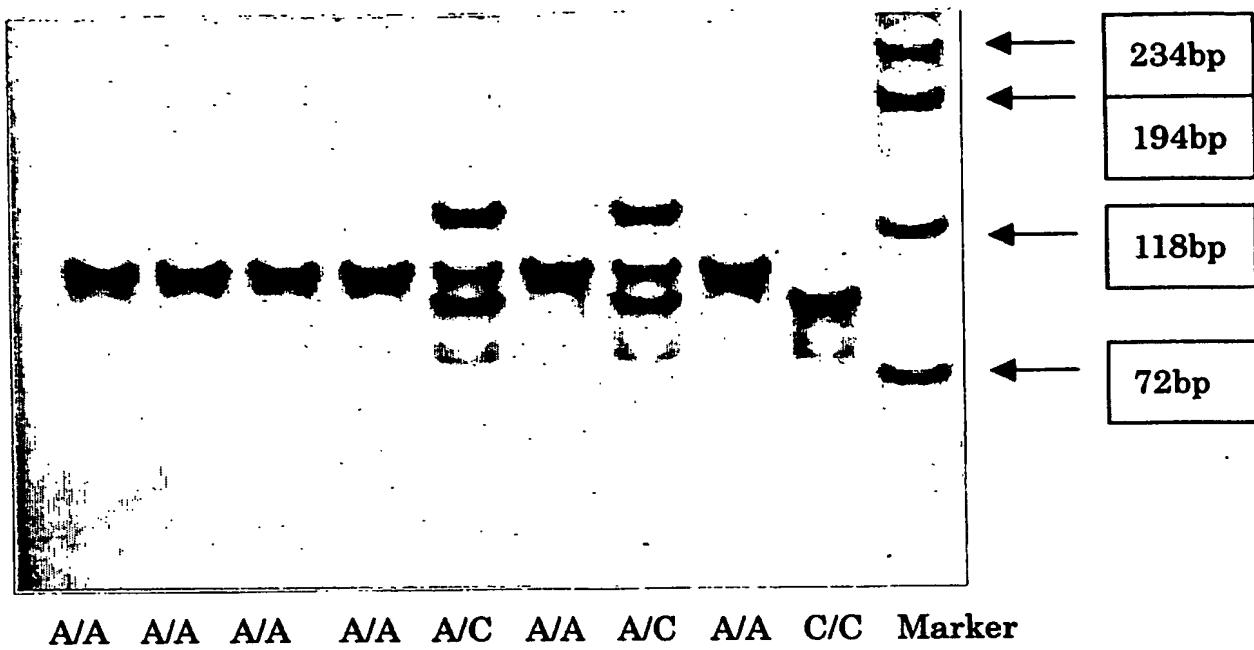


図 5

CGACTGGCTC	CTGAGGGAGC	<u>GCAGT</u> GACAC	<u>CAG</u> CGACAAG	<u>AGG</u> AAGTTCC	TGAAGGGAGCG
プライマ- F					
GCTGATGGGG	CTGACCCAGG	<u>CTC</u> GGCGCG	<u>GCT</u> CGCCAAG	<u>TT</u> CCCAGGCT	<u>GA</u> AACGGGACT
11-bp 欠損					
CTCAGGGGG	CCCGGGGTCT	CCAGGGCACG	TCTCCAGGCA	ACGAGGACCA	ACCTCCTTCC
プライマ- R					

6 / 6

図 6



1 / 1 8

SEQUENCE LISTING

<110> National Institute of Agrobiological Sciences

<120> Method to estimate the inherited resistance and susceptibility
to RNA virus disease in pigs

<130> MOA-A0214P

<140>

<141>

<150> JP 2002-313076

<151> 2002-10-28

<160> 10

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 2545

<212> DNA

<213> Sus scrofa

<220>

<221> CDS

2 / 1 8

<222> (101).. (2092)

<220>

<221> polyA_signal

<222> (2517).. (2522)

<400> 1

gtaagtgtgg gagaacagcc ctgcatttct gctgacgggt caacgtcaca gcgtcaaaga 60

aaaggaaggt acatttcagc tgaactgatc aaggaggaag atg gtt tat tcc agc 115

Met Val Tyr Ser Ser

1 5

tgt gaa agt aaa gaa cct gat tca gtt tct gca tcc aat cac ctg tta 163

Cys Glu Ser Lys Glu Pro Asp Ser Val Ser Ala Ser Asn His Leu Leu

10 15 20

cta aat ggg aat gat gaa ttg gtg gag aaa agt cac aaa aca ggg cct 211

Leu Asn Gly Asn Asp Glu Leu Val Glu Lys Ser His Lys Thr Gly Pro

25 30 35

gag aac aac ctg tac agc cag tac gag gag aaa gtg cgg ccc tgc atc 259

Glu Asn Asn Leu Tyr Ser Gln Tyr Glu Glu Lys Val Arg Pro Cys Ile

40 45 50

gac ctc atc gac tca ctg cgg gcc ctg ggc gtg gag cag gac ctg gcc 307

3 / 1 8

Asp Leu Ile Asp Ser Leu Arg Ala Leu Gly Val Glu Gln Asp Leu Ala

55

60

65

ctg ccc gcc atc gcc gtc atc ggg gac cag agt tcg ggc aag agc tcc 355

Leu Pro Ala Ile Ala Val Ile Gly Asp Gln Ser Ser Gly Lys Ser Ser

70

75

80

85

gtg ctg gag gcc ctg tcg ggg gtc gct ctc ccc aga ggc agc gga att 403

Val Leu Glu Ala Leu Ser Gly Val Ala Leu Pro Arg Gly Ser Gly Ile

90

95

100

gtg aca aga tgc cct ctt gtg ctg aaa ttg aaa aaa ctc gtg aac gaa 451

Val Thr Arg Cys Pro Leu Val Leu Lys Leu Lys Lys Leu Val Asn Glu

105

110

115

gaa gac gaa tgg aag ggc aaa gtc agt tac cgg gac agc gag att gag 499

Glu Asp Glu Trp Lys Gly Lys Val Ser Tyr Arg Asp Ser Glu Ile Glu

120

125

130

ctt tca gat gct tcg cag gtg gaa aag gaa gtc agc gca gcc cag att 547

Leu Ser Asp Ala Ser Gln Val Glu Lys Glu Val Ser Ala Ala Gln Ile

135

140

145

gcc atc gct ggg gaa ggc gtg gga atc agt cat gag cta atc agt ctg 595

Ala Ile Ala Gly Glu Gly Val Gly Ile Ser His Glu Leu Ile Ser Leu

150

155

160

165

4 / 1 8

gag gtc agc tcc cct cat gtc cca gat ctg acc ctc ata gac ctt cct 643
Glu Val Ser Ser Pro His Val Pro Asp Leu Thr Leu Ile Asp Leu Pro
170 175 180

ggc atc acc agg gta gct gta ggc aat cag cca tac gac atc gaa tac 691
Gly Ile Thr Arg Val Ala Val Gly Asn Gln Pro Tyr Asp Ile Glu Tyr
185 190 195

cag atc aag tct ctg atc aag aag tac atc tgt aag cag gag acc atc 739
Gln Ile Lys Ser Leu Ile Lys Tyr Ile Cys Lys Gln Glu Thr Ile
200 205 210

aac ttg gtg gtg gtc ccc tgt aac gtg gac att gcc acc acg gag gcg 787
Asn Leu Val Val Val Pro Cys Asn Val Asp Ile Ala Thr Thr Glu Ala
215 220 225

ctg cgc atg gcc cag gag gtg gac ccc gaa gga gac agg acc atc ggg 835
Leu Arg Met Ala Gln Glu Val Asp Pro Glu Gly Asp Arg Thr Ile Gly
230 235 240 245

atc ttg acg aag ccg gat ctg gtg gac aaa ggc act gag gac aag ata 883
Ile Leu Thr Lys Pro Asp Leu Val Asp Lys Gly Thr Glu Asp Lys Ile
250 255 260

gtg gac gtg gcg aga aac ctg gtc ttc cac ctg aag aag ggc tac atg 931

5 / 1 8

Val Asp Val Ala Arg Asn Leu Val Phe His Leu Lys Lys Gly Tyr Met

265

270

275

att gtc aag tgc agg ggc cag cag gac atc cag gag cag ctg agc ctg 979

Ile Val Lys Cys Arg Gly Gln Gln Asp Ile Gln Glu Gln Leu Ser Leu

280

285

290

gcc aag gcc ctg cag aag gag cag gcc ttc ttt gaa aac cac gca cat 1027

Ala Lys Ala Leu Gln Lys Glu Gln Ala Phe Phe Glu Asn His Ala His

295

300

305

ttc agg gat ctt ctg gag gaa ggg cgg gcc acg atc ccc tgc ctg gca 1075

Phe Arg Asp Leu Leu Glu Glu Gly Arg Ala Thr Ile Pro Cys Leu Ala

310

315

320

325

gaa aga ctg acc tct gaa ctc atc atg cac atc tgt aaa act ctg ccc 1123

Glu Arg Leu Thr Ser Glu Leu Ile Met His Ile Cys Lys Thr Leu Pro

330

335

340

ctg tta gaa aac caa ata aaa gag agt cac cag aaa ata aca gag gag 1171

Leu Leu Glu Asn Gln Ile Lys Glu Ser His Gln Lys Ile Thr Glu Glu

345

350

355

tta cag aag tat ggc tcc gat att cca gag gat gaa agc ggg aag atg 1219

Leu Gln Lys Tyr Gly Ser Asp Ile Pro Glu Asp Glu Ser Gly Lys Met

360

365

370

6 / 1 8

ttt ttt ctg ata gat aaa atc gat gca ttt aat agt gat atc act gct 1267

Phe Phe Leu Ile Asp Lys Ile Asp Ala Phe Asn Ser Asp Ile Thr Ala

375

380

385

ttg ata caa gga gag gaa ctg gtg gag tac gag tgt cgg ctg ttt 1315

Leu Ile Gln Gly Glu Glu Leu Val Val Glu Tyr Glu Cys Arg Leu Phe

390

395

400

405

acc aag atg cga aat gag ttc tgc aga tgg agt gct gtg gtt gaa aag 1363

Thr Lys Met Arg Asn Glu Phe Cys Arg Trp Ser Ala Val Val Glu Lys

410

415

420

aat ttc aaa aat ggt tat gac gcc ata tgt aaa caa atc cag ctc ttc 1411

Asn Phe Lys Asn Gly Tyr Asp Ala Ile Cys Lys Gln Ile Gln Leu Phe

425

430

435

gaa aat cag tac agg ggg aga gag ttg cca ggg ttt gtg aat tat aag 1459

Glu Asn Gln Tyr Arg Gly Arg Glu Leu Pro Gly Phe Val Asn Tyr Lys

440

445

450

aca ttt gaa acc atc att aag aag cag gtc agt gtc ctg gaa gag cca 1507

Thr Phe Glu Thr Ile Ile Lys Lys Gln Val Ser Val Leu Glu Glu Pro

455

460

465

gcc gtg gac atg ctg cac aca gtg act gat tta gtc cgg ctc gcc ttc 1555

7 / 1 8

Ala Val Asp Met Leu His Thr Val Thr Asp Leu Val Arg Leu Ala Phe

470 475 480 485

aca gat gtt tca gaa aca aat ttt aat gaa ttt ttc aac ctc cac aga 1603

Thr Asp Val Ser Glu Thr Asn Phe Asn Glu Phe Phe Asn Leu His Arg

490 495 500

act gcc aag tcc aaa att gaa gac att aaa tta gaa caa gaa aaa gaa 1651

Thr Ala Lys Ser Lys Ile Glu Asp Ile Lys Leu Glu Gln Glu Lys Glu

505 510 515

gct gag acg tcg atc cgg ctc cac ttc caa atg gag cag atc gtg tac 1699

Ala Glu Thr Ser Ile Arg Leu His Phe Gln Met Glu Gln Ile Val Tyr

520 525 530

tgc cag gac cag gtc tat cgg ggc gcg ctg cag aag gtc aga gag aag 1747

Cys Gln Asp Gln Val Tyr Arg Gly Ala Leu Gln Lys Val Arg Glu Lys

535 540 545

gag gcg gaa gaa gaa aag aac aga aaa tca aac cag tac ttt ctg tcg 1795

Glu Ala Glu Glu Glu Lys Asn Arg Lys Ser Asn Gln Tyr Phe Leu Ser

550 555 560 565

tcg ccg gcc ccc tcc tca gac ccc tcc ata gcc gag atc ttt cag cac 1843

Ser Pro Ala Pro Ser Ser Asp Pro Ser Ile Ala Glu Ile Phe Gln His

570 575 580

8 / 1 8

ctg att gcc tac cat cag gag gtc ggc aag cgc atc tcc agc cac atc 1891
Leu Ile Ala Tyr His Gln Glu Val Gly Lys Arg Ile Ser Ser His Ile
585 590 595

cct ctg atc atc cag ttc ttc atc ctc cgg acc ttt ggg cag cag ctg 1939
Pro Leu Ile Ile Gln Phe Phe Ile Leu Arg Thr Phe Gly Gln Gln Leu
600 605 610

cag aag agc atg ctg cag ctg cag aac aag gac caa tac gac tgg 1987
Gln Lys Ser Met Leu Gln Leu Leu Gln Asn Lys Asp Gln Tyr Asp Trp
615 620 625

ctc ctg agg gag cgc agt gac acc agc gac aag agg aag ttc ctg aag 2035
Leu Leu Arg Glu Arg Ser Asp Thr Ser Asp Lys Arg Lys Phe Leu Lys
630 635 640 645

gag cgg ctg atg cgg ctg acc cag gct cgg cgc cgg ctc gcc aag ttc 2083
Glu Arg Leu Met Arg Leu Thr Gln Ala Arg Arg Arg Leu Ala Lys Phe
650 655 660

cca ggc tga accggactct ccaggcggcc cgggtctcc agggcacgtc 2132
Pro Gly

tccaggcaac gaggaccaac ctccctccct aacagactag catcatgagc tcctgtttcg 2192

9 / 18

cacatcctcc tgtggtagt agactctaaa gccaccgtcc ctgctgttag tggctgagga 2252

cttagcaaga agctgtgata agcacgctgg ctgcaagcat caggccattt acttgaatga 2312

gccccgccaa cgcttcgcct cccgcgcctc tctccatccc tctctccatc cttctctcca 2372

tccctgtata ggatactggt ccccgcatag catcatagaa gggtcattct ggtttctgta 2432

caaggctttc acgccccatg tcttagggc attacagcca cctgtgtgga tggatgcaca 2492

tagaaggccta ttcttttat ttgtaataaa ctgggtctta ccagcaaaaa aaa 2545

<210> 2

<211> 663

<212> PRT

<213> Sus scrofa

<400> 2

Met Val Tyr Ser Ser Cys Glu Ser Lys Glu Pro Asp Ser Val Ser Ala

1

5

10

15

Ser Asn His Leu Leu Leu Asn Gly Asn Asp Glu Leu Val Glu Lys Ser

20

25

30

His Lys Thr Gly Pro Glu Asn Asn Leu Tyr Ser Gln Tyr Glu Glu Lys

1 0 / 1 8

35

40

45

Val Arg Pro Cys Ile Asp Leu Ile Asp Ser Leu Arg Ala Leu Gly Val

50

55

60

Glu Gln Asp Leu Ala Leu Pro Ala Ile Ala Val Ile Gly Asp Gln Ser

65

70

75

80

Ser Gly Lys Ser Ser Val Leu Glu Ala Leu Ser Gly Val Ala Leu Pro

85

90

95

Arg Gly Ser Gly Ile Val Thr Arg Cys Pro Leu Val Leu Lys Leu Lys

100

105

110

Lys Leu Val Asn Glu Glu Asp Glu Trp Lys Gly Lys Val Ser Tyr Arg

115

120

125

Asp Ser Glu Ile Glu Leu Ser Asp Ala Ser Gln Val Glu Lys Glu Val

130

135

140

Ser Ala Ala Gln Ile Ala Ile Ala Gly Glu Gly Val Gly Ile Ser His

145

150

155

160

Glu Leu Ile Ser Leu Glu Val Ser Ser Pro His Val Pro Asp Leu Thr

165

170

175

1 1 / 1 8

Leu Ile Asp Leu Pro Gly Ile Thr Arg Val Ala Val Gly Asn Gln Pro

180 185 190

Tyr Asp Ile Glu Tyr Gln Ile Lys Ser Leu Ile Lys Lys Tyr Ile Cys

195 200 205

Lys Gln Glu Thr Ile Asn Leu Val Val Val Pro Cys Asn Val Asp Ile

210 215 220

Ala Thr Thr Glu Ala Leu Arg Met Ala Gln Glu Val Asp Pro Glu Gly

225 230 235 240

Asp Arg Thr Ile Gly Ile Leu Thr Lys Pro Asp Leu Val Asp Lys Gly

245 250 255

Thr Glu Asp Lys Ile Val Asp Val Ala Arg Asn Leu Val Phe His Leu

260 265 270

Lys Lys Gly Tyr Met Ile Val Lys Cys Arg Gly Gln Gln Asp Ile Gln

275 280 285

Glu Gln Leu Ser Leu Ala Lys Ala Leu Gln Lys Glu Gln Ala Phe Phe

290 295 300

Glu Asn His Ala His Phe Arg Asp Leu Leu Glu Glu Gly Arg Ala Thr

305 310 315 320

1 2 / 1 8

Ile Pro Cys Leu Ala Glu Arg Leu Thr Ser Glu Leu Ile Met His Ile

325

330

335

Cys Lys Thr Leu Pro Leu Leu Glu Asn Gln Ile Lys Glu Ser His Gln

340

345

350

Lys Ile Thr Glu Glu Leu Gln Lys Tyr Gly Ser Asp Ile Pro Glu Asp

355

360

365

Glu Ser Gly Lys Met Phe Phe Leu Ile Asp Lys Ile Asp Ala Phe Asn

370

375

380

Ser Asp Ile Thr Ala Leu Ile Gln Gly Glu Glu Leu Val Val Glu Tyr

385

390

395

400

Glu Cys Arg Leu Phe Thr Lys Met Arg Asn Glu Phe Cys Arg Trp Ser

405

410

415

Ala Val Val Glu Lys Asn Phe Lys Asn Gly Tyr Asp Ala Ile Cys Lys

420

425

430

Gln Ile Gln Leu Phe Glu Asn Gln Tyr Arg Gly Arg Glu Leu Pro Gly

435

440

445

Phe Val Asn Tyr Lys Thr Phe Glu Thr Ile Ile Lys Lys Gln Val Ser

1 3 / 1 8

450 455 460

Val Leu Glu Glu Pro Ala Val Asp Met Leu His Thr Val Thr Asp Leu
465 470 475 480Val Arg Leu Ala Phe Thr Asp Val Ser Glu Thr Asn Phe Asn Glu Phe
485 490 495Phe Asn Leu His Arg Thr Ala Lys Ser Lys Ile Glu Asp Ile Lys Leu
500 505 510Glu Gln Glu Lys Glu Ala Glu Thr Ser Ile Arg Leu His Phe Gln Met
515 520 525Glu Gln Ile Val Tyr Cys Gln Asp Gln Val Tyr Arg Gly Ala Leu Gln
530 535 540Lys Val Arg Glu Lys Glu Ala Glu Glu Lys Asn Arg Lys Ser Asn
545 550 555 560Gln Tyr Phe Leu Ser Ser Pro Ala Pro Ser Ser Asp Pro Ser Ile Ala
565 570 575Glu Ile Phe Gln His Leu Ile Ala Tyr His Gln Glu Val Gly Lys Arg
580 585 590

1 4 / 1 8

Ile Ser Ser His Ile Pro Leu Ile Ile Gln Phe Phe Ile Leu Arg Thr

595

600

605

Phe Gly Gln Gln Leu Gln Lys Ser Met Leu Gln Leu Leu Gln Asn Lys

610

615

620

Asp Gln Tyr Asp Trp Leu Leu Arg Glu Arg Ser Asp Thr Ser Asp Lys

625

630

635

640

Arg Lys Phe Leu Lys Glu Arg Leu Met Arg Leu Thr Gln Ala Arg Arg

645

650

655

Arg Leu Ala Lys Phe Pro Gly

660

<210> 3

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: an artificially synthesized primer sequence

<400> 3

15 / 18

ctgaaagatc tcggctatgg agg

23

<210> 4

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:an artificially synthesized primer sequence

<400> 4

aagaagctga gacgtcgatc cggct

25

<210> 5

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:an artificially synthesized primer sequence

<400> 5

1 6 / 1 8

aagcgcacatccagccacatc

21

<210> 6

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:an artificially synthesized primer sequence

<400> 6

aagacatgg gcgtgaaagg

20

<210> 7

<211> 53

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:an artificially synthesized primer sequence

<400> 7

1 7 / 1 8

ggggacaagt ttgtacaaaa aagcaggctg tcacagcgtc aaagaaaaagg aag 53

<210> 8

<211> 49

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:an artificially synthesized primer sequence

<400> 8

ggggaccact ttgtacaaga aagctgggtc cttctatgtat gctatgcgg 49

<210> 9

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:an artificially synthesized primer sequence

<400> 9

1 8 / 1 8

agtgacagga gcgacaagag

20

<210> 10

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: an artificially synthesized primer sequence

<400> 10

cctggagagt ccggttca

18

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/13767

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.C1⁷ C12N15/12, C07K16/18, C12Q1/68

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
Int.C1⁷ C12N15/12, C07K16/18, C12Q1/68

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
WPI (DIALOG), BIOSIS (DIALOG), JSTPlus (JOIS), GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq,
SwissProt/PIR/GeneSeq

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X A	Database Medline, National Library of Medicine, PMID:10234572, MOROZUMI T. et al., Three types of polymorphisms in exon 14 in porcine Mx1 gene., abstract, Biochem.Genet.2001, Vol.39, No.7-8, pages 251 to 260	11-13 1-10,14-15
X A	ASANO A. et al., "Buta no Virus Teikosei Idenshi Mx no Kino Kaiseki", Japanese Society of Veterinary Science Gakujutsu Shukai Koen Yoshishu 2001, Vol.132, page 146, PS-6060	11-13 1-10,14-15
A	JIN H.K. et al., Characterization and expression of the Mx1 gene in wild mouse species., Biochem. Genet.1998, Vol.36, No.9-10, pages 311 to 322	1-15

Further documents are listed in the continuation of Box C. See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"E" earlier document but published on or after the international filing date	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"&" document member of the same patent family
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search 14 November, 2003 (14.11.03)	Date of mailing of the international search report 02 December, 2003 (02.12.03)
---	--

Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office	Authorized officer
Facsimile No.	Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/13767

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P,A	ASANO A. et al., Polymorphisms and the antiviral property of porcine Mx1 protein., J.Vet.Med.Sci., 2002 December, Vol.64, No.12, pages 1085 to 1089	1-15

A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（IPC））

Int. Cl' C12N 15/12, C07K 16/18, C12Q 1/68

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料（国際特許分類（IPC））

Int. Cl' C12N 15/12, C07K 16/18, C12Q 1/68

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース（データベースの名称、調査に使用した用語）

WPI(DIALOG), BIOSIS(DIALOG), JSTPlus(JOIS), GenBank/EMBL/DDJB/GeneSeq, SwissProt/PIR/GeneSeq

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X A	Database Medline, National Library of Medicine, PMID:10234572, MOROZUMI T. et al, Three types of polymorphisms in exon 14 in porcine Mx1 gene., abstract, Biochem. Genet. 2001, Vol. 39, No. 7-8, p. 251-260	11-13 1-10, 14-15
X A	ASANO A. et al, ブタのウイルス抵抗性遺伝子Mxの機能解析. 日本獣医学会学術集会講演要旨集 2001, Vol. 132, p. 146, PS-6060	11-13 1-10, 14-15

 C欄の続きにも文献が列挙されている。 パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献（理由を付す）

「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

14. 11. 03

国際調査報告の発送日

02.12.03

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官（権限のある職員）

富永 みどり

4 N 9152



電話番号 03-3581-1101 内線 3448

C(続き)引用文献の カテゴリー*	関連すると認められる文献 引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	JIN H. K. et al, Characterization and expression of the Mx1 gene in wild mouse species. Biochem. Genet. 1998, Vol. 36, No. 9-10, p. 311-322	1-15
PA	ASANO A. et al, Polymorphisms and the antiviral property of porcine Mx1 protein. J. Vet. Med. Sci. 2002 Dec., Vol. 64, No. 12, p. 1085-1089	1-15

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- BLACK BORDERS**
- IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- FADED TEXT OR DRAWING**
- BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- SKEWED/SLANTED IMAGES**
- COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- GRAY SCALE DOCUMENTS**
- LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.